

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Intelligens MRI kontrasztanyagok: szintézis és kémiai jellemzés

Botár Richárd

témavezető: Dr. Kálmán Ferenc Krisztián



DEBRECENI EGYETEM
Természettudományi és Informatikai Doktori Tanács
Kémiai Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2023.

Bevezetés és célkitűzések

Napjaink orvoslása már-már elképzelhetetlen lenne képalkotó diagnosztikai eszközök nélkül, amelyek segítségével nem-invazív vizsgálatokat követően tudunk könnyen és gyorsan diagnosztizálni súlyos kimenetelű betegségeket már korai fázisban is. Az egyik leggyakrabban alkalmazott technika a mágneses rezonanciás képalkotás (MRI), amelynek nagy előnye, hogy az emberi szervezet állapotát, az abban található nagymennyiségű víz segítségével képes feltérképezni. Ugyanakkor, az esetek körülbelül felében a diagnosztikai potenciál növelése érdekében kontrasztanyagot alkalmaznak, amelyek paramágneses sajátsággal bírnak.

Ma a klinikumban többnyire különböző ligandumok, elsősorban poliaminopolikarboxilátok paramágneses fémionokkal alkotott komplexeit, azok között is leginkább Gd^{3+} -ion (GBCAs – Gadolinium Based Contrast Agents) kelátjait alkalmazzák. A 2000-es évek elején fedezték fel a nefrogén szisztémás fibrózis (NSF) nevű betegséget, amit a kontrasztos vizsgálatok során a szervezetben felszabadult szabad Gd^{3+} -ion toxikus hatásának tulajdonítanak. Az NSF ugyan csak nyíltláncú kontrasztanyagokkal kezelt, csökkent vesefunkcióval rendelkező betegek esetén volt jelentős, de felhívta a figyelmet arra, hogy érdemes fenntartásokkal kezelni a Gd^{3+} -alapú kontrasztanyagok alkalmazását. Továbbá, megfigyelték egészséges vesefunkcióval rendelkező páciensek esetén is, hogy a kontrasztanyag (vagy a Gd^{3+} -ion) a vizsgálatok során képes dúsulni egyes szövetekben – köztük az agyban és a csontokban is.⁵ Sorozatos vizsgálatok esetén ez a jelenség a kapott kép intenzitásának romlásához vezet, hiszen a háttér intenzitásának növekedését okozza, így a későbbi vizsgálatok során (ez körülbelül félévenkénti gyakoriságot jelent egy beteg esetében) a kontrasztanyagot egyre nagyobb dózisban kell alkalmazni a megfelelően kontrasztosság eléréséhez.

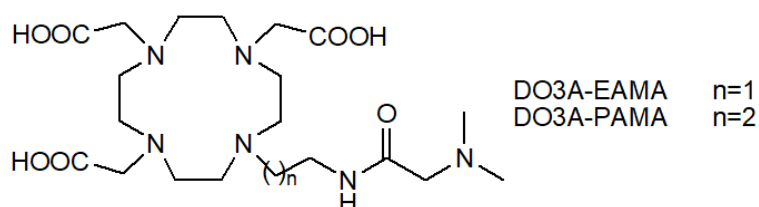
Mindezen túl, a kontrasztos MR vizsgálatok éves szinten tonnás nagyságrendű gadolínium igénnyel rendelkeznek, amely a vizsgálatot követően előbb-utóbb a szennyvizekbe kerül. A nehézfém koncentrációjának növekedését (különösen a diagnosztikai központokból távozó vizekben) pozitív gadolínium anomáliaként ismerik. Manapság ezt még nem sorolják a megoldandó problémák körébe, de az egyre inkább teret hódító zöld kémia jegyében a későbbiekben biztosan foglalkozni kell majd a kérdéssel.

Ezen problémák hatására 2017-ben az Európai Gyógyszerügynökség javaslatot tett (EMA/424715/2017) a nyílt láncú GBCA-k közül a Magnevist és az Omniscan kivonására, a Multihance esetén pedig annak korlátozott alkalmazására. Már ezt megelőzően, az MRI

kontrasztanyagok alkalmazása körül kialakult bizonytalanság miatt, megnőtt a biztonságosabb kontrasztanyagok iránti igény, ami természetesen a kutatás fellendülését is eredményezte. A kontrasztanyagok biztonságosabb felhasználásáért, ha csak az inertség kérdését tekintjük, alapvetően két dolgot tehetünk. Az egyik, hogy növeljük a Gd^{3+} -tartalmú komplexek inertségét, hogy időt biztosítsunk azok teljes kiürülésére, a másik, hogy lecseréljük a Gd^{3+} -at a szervezet számára jobban tolerálható paramágneses fémionra (pl. Mn^{2+} vagy Fe^{3+}).

A szervezet egyes biológiai folyamatai előre jelezhetik egy betegség korai stádiumát még az anatómiai elváltozás megjelenése előtt. A korai diagnózis felállítása érdekében igény mutatkozik olyan intelligens kontrasztanyagok fejlesztésére, ahol ezeket a folyamatokat monitorozni tudjuk. Az ilyen vizsgálatok esetében mindig alkalmaznunk kell kontrasztanyagot, ami érzékeny egy adott paraméter változására (például anion/kation koncentráció-, pH-változás).

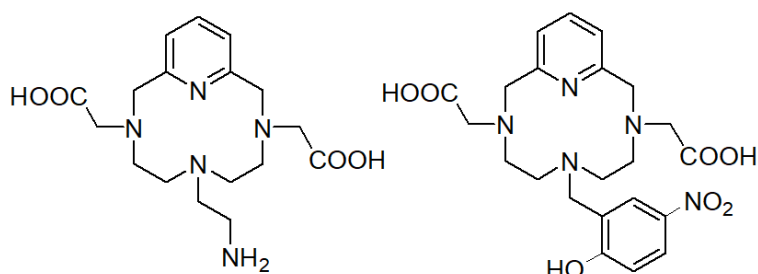
Az egyik vizsgálható fémion a Ca^{2+} , amely fontos szerepet tölt be a szervezetben, jelen van többek között az agyban, és koncentrációja jelentős mértékben változik a neurotranszmitterek idegsejtekből történő felszabadulása során. Angelovski és munkatársai vizsgálták több, szimmetrikus Ca^{2+} -ion jelenlétére szelektív Gd^{3+} -ion tartalmú komplex relaxációs tulajdonságait, ahol a Ca^{2+} -ionra érzékeny egységként EGTA-típusú molekularészletet alkalmaztak. Ez a molekula hídként köt össze két makrociklusos egységet, amelyek felelősek a Gd^{3+} -ionnal való kölcsönhatásért, a komplexeket relaxációs szempontból karakterizálták, de elmaradt azok egyensúlyi és kinetikai vizsgálata. **Így célul tűztük ki a komplexek modellvegyületeinek számító makrociklusos ligandumok (DO3A-EAMA és DO3A-PAMA) termodinamikai, kinetikai és relaxációs tulajdonságainak teljeskörű vizsgálatát, különös tekintettel azok Gd^{3+} -ionnal alkotott komplexeire (1. ábra).** Az egyes modellvegyületek elemzésének eredményeiből jó eséllyel tudnánk következtetni azok kontrasztanyagként való alkalmazhatóságára.



1. Ábra. A DO3A-EAMA és DO3A-PAMA Ca^{2+} -szenzornak szánt ligandum modellvegyületeinek szerkezete

Doktori munkám során a másik jelentős tématerület a Mn^{2+} -alapú okos kontrasztanyagok fejlesztése volt. Csoportunk Mn^{2+} -komplexekkel szerzett jelentős kutatási tapasztalatára támaszkodva olyan alapvázat kerestünk, amely jó termodinamikai, kinetikai és relaxációs paraméterekkel rendelkező kelátokat alakít ki a Mn^{2+} -vel, továbbá rendelkezik az alapvázon egy szabad, szubsztituálható atommal, amelyet módosítva alakíthatjuk ki az intelligens viselkedésért felelős funkciót. A választás a 3,9-PC2A ligandumra esett, ugyanis amellet, hogy Mn^{2+} -komplexének paraméterei biztatóak az *in vivo* alkalmazás tekintetében ($\log K_{\text{MnL}} = 17,09$; $r_{1p} = 2,91 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ [25°C ; $0,49 \text{ T}$; $\text{pH} = 7,4$]; $t_{1/2} = 21,0 \text{ óra}$ [$\text{pH} = 7,4$; $c_{\text{Mn}^{2+}} = 0,01 \text{ mM}$]) a piridin-N atommal szembeni, *transz* helyzetű N-atom alkalmas különböző oldalláncok kapcsolására.

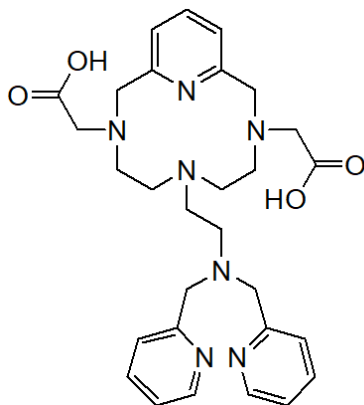
A szervezet pH-ja elég jól meghatározott egyes sejtekben és szövetekben, így azok akár kismértékű változása is nagy gondot tud okozni, illetve jól előrevetíti különböző kórképek kialakulását. **Ezért céljaink között szerepelt, hogy különböző oldalláncok alkalmazásával olyan PC2A-származék ligandumokat állítsunk elő és vizsgáljunk, amelyek Mn^{2+} -komplexe érzékenységet mutat a pH-értékének változására ($\text{pH} = 7,4 \pm 0,6$).** Egyik esetben az érzékenységet felelő oldalláncként etilamin-egységet (PC2A-EA), másik esetben pedig *p*-nitrofenol-egységet (PC2A-NP) alkalmaztunk. (2. ábra).



2. Ábra. A PC2A-EA és PC2A-NP pH-szenzornak szánt ligandumok szerkezetei

A prosztatarák az 50 év feletti férfiak körében a rákos megbetegedések csaknem 10 %-át teszi ki. Gyakran teljesen tünetmentes, lappangó állapotban kezdi pusztítani a szervezetet, sok esetben a diagnózist csak az anatómiai elváltozás után tudják felállítani. Az egészséges és beteg prosztata Zn^{2+} -kiválasztása merőben különbözik egymástól, rákos elváltozás esetén annak koncentrációja drasztikusan, akár ötödére csökken. Nyomon követve ezt a koncentrációváltozást lehetőség nyílhat korai diagnózis felállítására, így **terveink között szerepelt egy olyan PC2A-származék ligandum előállítása is, amely Mn^{2+} -komplexe segítségével képesek lehetünk követni a Zn^{2+} -ion koncentráció fluktuációját.** Ehhez olyan

egységet kellett ráépíteni a kiválasztott platformra, ami kellő szelektivitással rendelkezik a Zn^{2+} -ionra, így esett a választás a dipikolilamin molekulára (3. ábra). Együtműködés keretein belül további céljaink közt szerepelt, hogy a Mn^{2+} -komplexét egereken, *in vivo* körülmények között is vizsgáljuk.



3. Ábra. A PC2A-DPA Zn^{2+} -szenzornak szánt ligandum szerkezete

Alkalmazott vizsgálati módszerek

A DO3A-EAMA és DO3A-PAMA ligandumok külföldi partnerlaboratóriumból származtak és további tisztítást nem igényeltek. A PC2A-EA, PC2A-NP, PC2A-DPA ligandumokat irodalomból ismert reakciókkal állítottuk elő és a reakciósorok végtermékeit félpreparatív HPLS-s technikával tisztítottuk meg. A reakciók előrehaladást vékonyrétegkromatográfiás és analitikai HPLC-s módszerrel követtük. A termékek szerkezetéről (és tisztaságáról) ^1H -, ^{13}C -NMR és ESI-MS spektroszkópiával győződünk meg.

A ligandumok protonálódási, és komplexeik stabilitási és protonálódási állandóit pH-potenciometriás és Gd^{3+} -komplexek esetén ^1H -relaxometriás módszerrel (20 MHz) határoztuk meg, 0,15 M NaCl ionerősség mellett, 25,0 °C-on. A Cu^{2+} -komplexek esetén UV-látható spektrofotometriát is alkalmaztunk azok nagy stabilitása miatt. A PC2A-EA ligandum esetén a protonálódási szekvenciát ^1H -NMR technika segítségével határoztuk meg.

A komplexek relaxációs tulajdonságait (vízcseresebesség, relaxivitas, aktiválási paraméterek) ^1H -relaxometria és hőmérsékletfüggő ^{17}O -NMR spektroszkópia segítségével vizsgáltuk. Az *in vitro* kísérleteket együttműködés keretében Philips Achivea 3T, Siemens Magnetom Essenza 1.5T és Mediso NanoScan PET/MRI 1T validált MR műszereken végeztük el, 1, 1,5 és 3 T térerősségen. Az *in vivo* felvételek a preklinikumban használt nanoScan PET/MRI 3T (Mediso Ltd., Magyarország) készüléken készültek, az állatkísérleteket az Európai Unió és a magyarországi törvényeknek megfelelően a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága regisztrálta (10/2019/DEMÁB).

A komplexek kinetikai viselkedését minden esetben legalább tízszeres kicserélő fémion felesleggel vizsgáltuk UV-látható spektrofotometriás (Cu^{2+}) vagy ^1H -relaxometriás (Zn^{2+}) módszerek alkalmazásával. A kicserélődési reakciókat minden esetben savas közegben követtük.

Új tudományos eredmények

1. A $[\text{Gd}(\text{DO3A-EAMA})]$ -komplex stabilitása és inertsége nagyobb, mint a $[\text{Gd}(\text{DO3A-PAMA})]$ -komplexet jellemző érték, habár látszólagos relaxivitása $\sim 1,5$ egységgel kisebb $\text{pH} = 7,4$ értéken. A látszólagos relaxivitásban mindkét komplex esetén a nagy pH -értékek felé haladva csökkenés mutatkozik.

Vizsgáltuk a DO3A-PAMA és DO3A-EAMA ligandumok egyensúlyi viszonyait, meghatároztuk azok protonálódási, illetve pár esszenciális fémionnal (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) és Gd^{3+} -ionnal kialakuló komplexeik protonálódási és stabilitási állandóit. Megállapítottuk, hogy a DO3A-PAMA ligandum makrociklusának bázicitása nagyobb, mint a DO3A-EAMA-é, ami az egy metilénsoporttal hosszabb oldallánc hatása lehet, mivel így, az abban megtalálható amidcsoport elektronszívó hatása kevésbé érvényesül. Az eredmények azt mutatták, hogy a DO3A és DOTA ligandumok megfelelő értékeihez képest a DO3A-PAMA és DO3A-EAMA ligandumok bázicitása kisebb, így komplexeik stabilitási állandó értékei rendre kisebbnek is adódtak a DO3A és DOTA komplexek megfelelő állandóinál (1. táblázat).

Ahogy az várható volt, a $[\text{Gd}(\text{DO3A-EAMA})]$ -komplexet jellemző stabilitási állandó nagyobb a $[\text{Gd}(\text{DO3A-PAMA})]$ -komplex állandójánál, ami az amid típusú oxigén koordinációjával megvalósuló kelátgyűrű tagszámának ($6 \rightarrow 7$) növekedésével magyarázható. Továbbá az is elmondható, hogy az oldallánc aminocsoportját jellemző protonálódási állandó ($\log K_3$) a komplexképződés során gyakorlatilag elhanyagolható mértékben változik, ami arra enged következtetni, hogy az aminocsoport nem vesz részt a komplexképződési folyamatban. Összességében az általunk vizsgált stabilitási állandók értékei elmaradnak a DO3A és DOTA-komplexeket jellemző értékektől, aminek magyarázata az, hogy csökken a töltéssel rendelkező donoratomok száma, valamint megbomlik a DOTA-komplexekre jellemző kompakt szerkezet.

A Gd^{3+} -komplexek relaxitását vizsgálva a két belsősférás vízmolekulát tartalmazó formára jellemző értékeket kaptunk ($q = 2$) $\text{pH} = 6$ értéken, ahol döntően $[\text{Gd}(\text{HDO3A-EAMA})]^+$ és $[\text{Gd}(\text{HDO3A-PAMA})]^+$ egyszeresen protonált részecskéi vannak jelen. Nagy pH -értékek felé haladva a relaxitásban csökkenés mutatkozik, ami az amid típusú oxigén koordinációjával magyarázható és a belső sférában egy vízmolekulát tartalmazó komplexekre jellemző.

A Gd^{3+} -komplexek inertségét vizsgálva elmondható, hogy az oldalláncban propilén-egységet tartalmazó $[Gd(DO3A-PAMA)]$ -komplex hozzávetőleg 6-szor labilisabb az $[Gd(DO3A-EAMA)]$ -komplexnél. A vizsgálat során alkalmazott pH-tartományban az oldallánc amidcsoportja nem koordinálódik a fémionhoz, a sebességi állandók különbsége a hosszabb szénlánc nagyobb flexibilitásának köszönhető, mivel ez a tulajdonság megkönnyíti az oldallánc aminocsoportja és az egyik acetátcsoport/makrociklus nitrogén közötti protontranszfert. A Gd^{3+} -komplexek felezési idejét $pH = 6$ értéken hasonlítjuk össze, mivel ezen a pH-értéken van jelen jellemző egyfajta (protonált) részecske az egyensúlyi rendszerben. A felezési idők messze elmaradnak a $[Gd(DOTA)]^-$ -komplekre jellemző értéktől, de még mindig elfogadható a gyakorlati alkalmazás tekintetében.

Mindezen tulajdonságokat figyelembe véve (kellően nagy termodinamikai stabilitás, elfogadható inertség és a jó relaxációnövelő hatás) a Ca^{2+} -szenzor komplexek gyakorlati alkalmazása elképzelhető. Továbbá az eredmények számos értékes információval látnak el minket további, Ca^{2+} -ion szenzitív kontrasztanyagok szánt ligandumok tervezése terén.

1. táblázat. A DO3A-PAMA és DO3A-EAMA, valamint az összehasonlításként használt ligandumok és azok Gd^{3+} -komplexeinek főbb fizikai-kémiai paraméterei (25,0 °C)

	DO3A-PAMA	DO3A-EAMA	DO3A	DOTA ^[a]
$\sum_{i=1}^2 \log K_i^H$	18,96	18,26	20,20	21,24
$\log K_{GdL}$	13,89(4)	14,59(5)	19,06	24,70
k_1 (M ⁻¹ s ⁻¹)	3,2±0,1	0,53±0,02	0,023	1,8x10 ⁻⁶
$t_{1/2}$ (óra) pH=7,4	1490	9125	8400	1,07x10 ⁸

[a] 0,1 M KCl

2. Előállítottuk a PC2A-EA, valamint a PC2A-NP-ligandumokat, amelyekben a pH-érzékeny funkcióért az oldalláncban az etilamin-, illetve a *p*-nitrofenol egység felel. A Mn^{2+} -komplexek kedvező termodinamikai tulajdonságai és inertsége mellett a $[Mn(PC2A-EA)]$ -komplex relaxivitása a vér fiziológiás pH-tartományában MRI-vel is detektálható módon változik.

Vizsgáltuk a PC2A-származék ligandumok Mn^{2+} -ionnal kialakuló komplexeinek fizikai-kémiai paramétereit azzal a céllal, hogy információt nyerjünk azok pH-érzékenysége felől az *in vivo* alkalmazásuk tekintetében. Munkákat a ligandumok sav-bázis tulajdonságainak vizsgálatával kezdtük. Ez alapján, ha a makrociklus nitrogénatomjaihoz tartozó protonálódási állandók értékeinek összegét hasonlítjuk össze ($\log K_1^H + \log K_3^H$), elmondható, hogy a PC2A-EA és PC2A-NP ligandumok esetében nagyobb értéket kaptunk, mint a PCTA-ligandumot jellemző érték, ami előrevetíti a komplexek nagyobb stabilitási állandó értékét is. NMR-spektroszkópiás titrálás segítségével a PC2A-EA ligandum esetén sikerült a protonálódási szekvenciát is leírni, így bebizonyítottuk, hogy a $\log K_2^H$ 8,93-as értéke az oldallánc aminocsoportjához tartozik (2. táblázat).

Megvizsgáltuk a ligandumok néhány fémionnal (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) kialakuló komplexének egyensúlyi viszonyait is. A gyakorlati alkalmazás tekintetében fontos Mn^{2+} -komplex stabilitási állandója a PC2A-EA komplexe esetén a legnagyobb és minden esetben nagyobb, mint a $[Mn(PCTA)]^-$ jellemző érték. A pMn értékek közel azonos és kiemelkedően jó stabilitást jeleznek.

Egy pH-szenzornak szánt komplex esetében nagyon fontos paraméter a Mn^{2+} -komplex protonálódási állandója, amelynek a fiziológiás pH-tartományba kell esnie. Ennek a feltételnek a $[Mn(PC2A-EA)]$ -komplex eleget is tesz.

Vizsgálva a komplexek relaxációs sajátságait látható, hogy $pH > 6$ esetben a $[Mn(PC2A-NP)]$ -komplex relaxivitása a külső szférás hozzájárulásra csökkent, míg a $[Mn(PC2A-EA)]$ -komplex longitudinális és transzverzális relaxitásának változása $pH = 6,8-7,4$ tartományban rendre $0,56 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $1,01 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (20 MHz-en, 25 °C-on mérve). Ez a különbség azonban sokkal számottevőbb a gyakorlatban is alkalmazott térerőn (128 MHz, 25 °C), ahol $0,82 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ és $4,92 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ értékeket kaptunk, ami már alkalmas az MRI-vel történő detektálásra. Az általunk vizsgált komplexek vízcseresebessége hozzávetőleg harmada a $[Mn(PC2A)]$ -komplexre jellemző értéknek ($12,6 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$), ami a beépített funkciók csoportok hatásával magyarázható.

Vizsgálva a komplexek inertségét és kiszámítva pH=7,4 értékre a komplexek felezési idejét, látható, hogy ugyan nagyságrendekkel kisebb értéket kaptunk a $[\text{Mn}(\text{PCTA})]^-$ -komplext jellemző értéknél, ám még így is kellően nagyok az *in vivo* alkalmazás tekintetében.

Összességében elmondható, hogy fizikai-kémiai paramétereit tekintve a $[\text{Mn}(\text{PC2A-EA})]$ -komplex, a klinikai gyakorlatban is biztonságosan alkalmazható, mint pH-érzékeny ágens.

2. táblázat. A PC2A-EA, PC2A-NP és az összehasonlításként használt ligandumok és azok Mn^{2+} -komplexeinek főbb fizikai-kémiai paramétere (25,0 °C)

	PC2A-EA	PC2A-NP	PC2A-SA	PCTA
$\log\beta_{\text{mc}}^{[a]}$	18,25	17,75	18,03	16,70
$\log K_{\text{MnL}}$	19,01(4)	18,05(6)	17,96	16,83
$\log K_{\text{MnHL}}$	6,88(2)	4,58(2)	8,77	1,96
pMn	9,27	9,67	9,77	9,74
Δr_2 ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) pH = 6,8 – 7,4	4,92	-	-	-
r_{1p} ($\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$)	2,5	1,6	4,0	-
k_{ex}^{298} ($\times 10^7 \text{ s}^{-1}$)	4,0 $\pm$ 0,1	4,5 $\pm$ 0,1	5,9	-
k_1 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	0,7 $\pm$ 0,1	0,60 $\pm$ 0,01	4,8 $\pm$ 0,2	8,2 $\times 10^{-2}$
k_2 ($\text{M}^{-2}\text{s}^{-1}$)	(3,2 $\pm$ 0,2) $\times 10^4$	-	-	3,5 $\times 10^2$
$t_{1/2}$ (pH = 7,4, óra)	6700	8050	1000	5,9 $\times 10^4$

[a] a makrociklust jellemző bázicitás

3. Előállítottuk a PC2A-DPA ligandumot, amelyben a Zn^{2+} -érzékeny molekularészlet a dipikolil-amin egység. A $[Mn(PC2A-DPA)]$ -komplex termodinamikai stabilitása és kinetikai inertsége jó. Ezek mellett *in vitro* és *in vivo* kísérletekben is képesek voltunk igazolni a Zn^{2+} -ionra való érzékenységet.

Vizsgáltuk a PC2A-DPA ligandum és a Mn^{2+} -ionnal kialakuló komplexének fizikai-kémiai tulajdonságait azzal a céllal, hogy információt nyerjünk annak Zn^{2+} -ion érzékenysége felől az *in vivo* alkalmazás tekintetében. A ligandum protonálódási állandóinak meghatározása után vizsgáltuk a ligandum néhány fémionnal (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+}) kialakuló komplexének egyensúlyi viszonyait is. A gyakorlati alkalmazás tekintetében fontos Mn^{2+} -komplex stabilitási állandója kisebb, mint a $[Mn(PCTA)]$ -komplexé, de még így is elég nagy ahhoz, hogy a szabad Mn^{2+} -ion mennyisége kevesebb, mint 0,1% legyen pH = 7,4 értéken (3. táblázat).

Az általunk vizsgált komplexek vízcseresebessége kisebb, mint a $[Mn(PC2A)]$ -komplekre jellemző érték, ami a beépített funkciócsoportok hatásával magyarázható. A komplex inertségét kellően nagyra találtuk az *in vivo* alkalmazhatóság tekintetében.

A Zn^{2+} -kötő PC2A-DPA ligandum esetén fontos paraméter a kétmagvú komplex stabilitási állandója, valamint a komplex HSA-val kialakuló kölcsönhatását jellemző affinitási állandó. Így részletesen tanulmányoztuk a Mn^{2+} -komplex, valamint annak Zn^{2+} -ionnal kialakuló kétmagvú komplexének relaxivitását különböző közegekben. A kapott eredmények alapján megállapítható, hogy a $[Mn(PC2A-DPA)(H_2O)Zn]^{2+}$ -HSA adduktban a kétmagvú komplex 60%-a kötött formában van jelen. A $[Mn(PC2A-DPA)Zn]^{2+}$ -komplex relaxivitása jelentős növekedést mutat HSA mellett, ami a kialakuló erős kölcsönhatással magyarázható, lehetővé téve az MRI-vel történő nyomon követést. Együttműködés keretein belül egérkísérletek végeztünk, ahol várakozásainknak megfelelően jó minőségű felvételeket sikerült készíteni egér prosztatáról, glükózzal történő stimulációt használva.

Összességében elmondható, hogy fizikai-kémiai jellemzés mellett *in vivo* kísérletekkel is sikerült alátámasztanunk a $[Mn(PC2A-DPA)]$ -komplex alkalmazhatóságát a klinikai gyakorlatban, mint Zn^{2+} -ionra érzékeny ágens.

3. táblázat. A PC2A-DPA és az összehasonlításként használt ligandumok és azok Mn^{2+} -komplexeinek főbb fizikai-kémiai paraméterei (25 °C)

	PC2A-DPA	PC2A	PC2A-EA
$\log \beta_{\text{mc}}^{[\text{a}]}$	16,49	18,22	18,25
$\log K_{\text{MnL}}$	15,87(6)	17,09	19,01
$\log K_{\text{Mn2L}}$	3,0(1)	–	–
pMn	8,79	8,64	9,27
$\log K_{\text{ZnL}}$	19,05(6)	19,49	21,4(1)
$\log K_{\text{Zn2L}}$	6,52(3)	–	–
$K_{D(\text{HSA})}$ (μM)	40±4	–	–
Δr_2 (mM ⁻¹ s ⁻¹) HSA-ban 0 → 1 ekv. Zn^{2+}	13,41 (~ 50%)	–	–
$r_{1\text{p}}$ (mM ⁻¹ s ⁻¹)	3,24	2,91	2,5
k_{ex}^{298} (x10 ⁷ s ⁻¹)	7,6±0,4	12,6	4,0
k_{obs} (s ⁻¹) pH = 6,00	(2,98±0,01) ×10 ⁻⁶	5,43×10 ⁻⁴	3,54×10 ⁻⁶
$t_{1/2}$ (pH = 6,00) (óra)	64,5	0,35	54,4

[a] a makrociklust jellemző bázicitás

Az eredmények hasznosításának lehetőségei

Habár a vizsgált ligandumok komplexeinek koordinációs kémiai karakterizálása többnyire alapkutatás jellegű, a [Mn(PC2A-EA)]-komplex esetén *in vitro*, míg a [Mn(PC2A-DPA)] esetén *in vivo* kísérletekkel is igazoltuk azok alkalmazhatóságát. Továbbá eredményeink nagyban hozzájárulnak további intelligens MRI-kontrasztanyagok fejlesztéséhez.

A DO3A-EAMA és DO3A-PAMA ligandumok Gd³⁺-komplexeinek jellemzése során rámutattunk arra, hogy az oldalláncban alkalmazott alkillánc hossza jelentős befolyással van a komplex inertségére. Megmutattuk azt is, hogy a Ca²⁺-szenzor komplexek termodinamikai és kinetikai szempontból alkalmazhatóak lehetnek, ugyanakkor azok inertségének növelése szükséges ahhoz, hogy minimalizálni tudjuk az *in vivo* disszociációt. Az általunk kapott eredmények ismeretében lehetőség nyílik új, jobb tulajdonságokkal rendelkező kontrasztanyagok szintézisére, akár Gd³⁺-, akár Mn²⁺-ionok alkalmazásával.

A PC2A-EA Mn²⁺-komplexe a vér fiziológiás pH-tartományában MRI-szempontról is értékelhető relaxivitás változással bír, így célszerű a vizsgálatokat *in vivo* kísérletekkel folytatni. ⁵²Mn radioizotóp alkalmazásával képesek lehetünk meghatározni a szervezet egyes szöveteiben a beinjektált [Mn(PC2A-EA)]-komplex mennyiségét, ami egyenes utat nyit a pH meghatározásához. Amennyiben a jelölési kísérletek sikerrel zárulnak, a [Mn(PC2A-EA)] a klinikai gyakorlatban is alkalmazható kontrasztanyaggá válhat. Sajnálatos módon, mivel a PC2A-NP ligandum Mn²⁺-komplexének protonálódási állandója nem a fiziológiás tartományba esik, így az nem alkalmazható a pH *in vivo* követésére. Ugyanakkor eredményeink hasznos információval szolgálnak a jó szenzor funkcióval rendelkező oldalláncok finomhangolása terén.

Végezetül, az általunk kapott eredmények alapján a [Mn(PC2A-DPA)]-komplex teljesen alkalmas a Zn²⁺-koncentráció fluktuációjának követésére, hiszen a vérben található fehérjékkel kialakuló erős kölcsönhatásnak köszönhetően jól mérhető relaxivitás változást kapunk. A pozitív eredménnyel zárult *in vivo* egérvizsgálatok tükrében a komplexet érdemes lehet további vizsgálni más állatmodelleken is, így közelítve a humán felhasználáshoz.

Köszönetnyilvánítás

Kutatásainkat a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH) FK-134551, K-128201, K-120224 és K-134694 sz. pályázatai és a GINOP-2.3.2-15-2016-00008 és GINOP-2.3.3-15-2016-00004 projektek támogatták. Külön köszönetünket fejezzük ki a Magyar Tudományos Akadémia Bolyai János Kutatási Ösztöndíjának, valamint az NKFIH Bolyai+ Felsőoktatási Fiatal Oktatói, Kutatói Ösztöndíjának (ÚNKP-22-5) az anyagi támogatásért. Továbbá köszönöm a DE Kémia Tudományok Doktori Iskola vezetőségének a programban való részvétel lehetőségét.



Nyilvántartási szám: DEENK/360/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Botár Richárd
Doktori Iskola: Kémiai Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10062376

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

1. **Botár, R.**, Molnár, E., Garda, Z., Madarasi, E., Trencsényi, G., Kiss, J., Kálmán, F. K., Tircsó, G.:
Synthesis and characterization of a stable and inert Mn-II-based Zn-II responsive MRI probe
for molecular imaging of glucose stimulated zinc secretion (GSZS).
Inorg. Chem. Front. 9 (3), 577-583, 2022. ISSN: 2052-1553.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/D1QI00501D>
IF: 7
2. **Botár, R.**, Molnár, E., Trencsényi, G., Kiss, J., Kálmán, F. K., Tircsó, G.: Stable and inert Mn(II)-
based and pH responsive contrast agents.
J. Am. Chem. Soc. 142 (4), 1662-1666, 2020. ISSN: 0002-7863.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jacs.9b09407>
IF: 15.419
3. Gündüz, S., Vibhute, S., **Botár, R.**, Kálmán, F. K., Tóth, I., Tircsó, G., Regueiro-Figueroa, M.,
Esteban-Gómez, D., Platas-Iglesias, C., Angelovski, G.: Coordination Properties of GdDO3A-
Based Model Compounds of Bioresponsive MRI Contrast Agents.
Inorg. Chem. 57 (10), 5973-5986, 2018. ISSN: 0020-1669.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b00473>
IF: 4.85





További közlemények

Idegen nyelvű, külföldi könyvrészletek (1)

4. Tircsó, G., Molnár, E., Csupász, T., Garda, Z., **Botár, R.**, Kálmán, F. K., Kovács, Z., Brücher, E., Tóth, I.: Gadolinium(III)-Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging. A Re-Appraisal.
In: Metal Ions in Bio-Imaging Techniques. Ed.: Astrid Sigel, Eva Freisinger and Roland K.O. Sigel, De Gruyter, Berlin, 39-70, 2021, (Metal Ions in Life Sciences, ISSN 1559-0836 ; 22)
ISBN: 9783110685701

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (3)

5. Csupász, T., Lihi, N., Fekete, Z., Nagy, A., **Botár, R.**, Forgács, V., Szikra, D. P., May, N. V., Tircsó, G., Kálmán, F. K.: Exceptionally fast formation of stable rigidified cross-bridged complexes formed with Cu(II) isotopes for Molecular Imaging.
Inorg. Chem. Front. 9 (6), 1217-1223, 2022. ISSN: 2052-1553.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/D1QI01526E>
IF: 7
6. Garda, Z., Molnár, E., Kálmán, F. K., **Botár, R.**, Nagy, V., Baranyai, Z., Brücher, E., Kovács, Z., Tóth, I., Tircsó, G.: Effect of the Nature of Donor Atoms on the Thermodynamic, Kinetic and Relaxation Properties of Mn(II) Complexes Formed With Some Trisubstituted 12-Membered Macrocyclic Ligands.
Front. Chem. 6, 1-14, 2018. EISSN: 2296-2646.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2018.00232>
IF: 3.782
7. Molnár, E., Váradi, B., Garda, Z., **Botár, R.**, Kálmán, F. K., Tóth, É., Tóth, I., Brücher, E., Tircsó, G.: Remarkable differences and similarities between the isomeric Mn(II)-cis- and trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N',N'-tetraacetate complexes.
Inorg. Chim. Acta. 472 (1), 254-263, 2018. ISSN: 0020-1693.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2017.07.071>
IF: 2.433

Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (1)

8. Csupász, T., Lihi, N., Fekete, Z., Nagy, A., **Botár, R.**, Forgács, V., Szikra, D. P., Tircsó, G., Kálmán, F. K.: Új típusú Cu(II)-komplexek radioteranosztikai alkalmazásokhoz.
In: 54. Komplexkémiái Kollokvium : az MKE Komplexkémiái Szakcsoportjának és az MTA Koordinációs Kémiai Munkabizottságának a rendezvénye, Magyar Kémikusok Egyesülete, Budapest, E31, 2021.





Idégen nyelvű absztrakt kiadványok (1)

9. Garda, Z., Fodor, T., Molnár, E., **Botár, R.**, Kálmán, F. K., Tóth, I., Tircsó, G., Kovács, Z.:

Thermodynamic and kinetic properties of Mn²⁺+cyclododecane derivative complexes: fine-tuning by the nature of donor atoms.

J. Biol. Inorg. Chem. 19 (S1), S686, 2014. ISSN: 0949-8257.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00775-014-1095-8>

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 40,484

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):

27,269

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2023.07.25.

